

[11] Japanese Unexamined Patent Publication No. 62-89699
[43] Publication Date: April 24, 1987
[54] Title of the Invention: Fibronectins
[21] Japanese Patent Application No. 61-151315
[22] Filing Date: June 27, 1986
Priority: [32] June 28, 1985
 [33] GB
 [31] 8516421
[72] Inventor: Francisco E. Baralle
[71] Applicant: Delta Biotechnology Limited

* * * * *

⑫ 公開特許公報 (A)

昭62-89699

Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和62年(1987)4月24日

C 07 K 7/10
A 61 K 35/74
37/00
37/04
C 07 K 3/18
13/00
15/12
C 12 N 15/00
C 12 P 21/00

8318-4H
7138-4C
7138-4C
7138-4C
8318-4H
8318-4H
8318-4H
7115-4B
6712-4B

※審査請求 未請求 発明の数 5 (全18頁)

⑭ 発明の名称 ファイブロネクチン

⑮ 特 願 昭61-151315

⑯ 出 願 昭61(1986)6月27日

優先権主張 ⑰ 1985年6月28日 ⑱ イギリス (GB) ⑲ 8516421

⑳ 発 明 者 フランシスコ イー、 イギリス国オウエツクス5, オックスフォード, キツドリ
バラレ ントン, ザ ムアーズ 178

㉑ 出 願 人 デルタ バイオテクノ イギリス国ディーイー14 1 ジェイゼット, パートンオン
ロジー リミテッド トレント, ハイ ストリート 137

㉒ 代 理 人 弁理士 浅 村 皓 外2名

最終頁に続く

明は其の作書(内容に変更なし)
明 細 書

1 発明の名称

ファイブロネクチン

2 特許請求の範囲

- (1) コラーゲンおよび/又はファイブリンに対し特異的親和性を有し、かつファイブロネクチンのコラーゲン結合部分および/又はファイブリン結合部分のアミノ酸残基と実質的に同じ順序のアミノ酸残基を含有する、ポリペプチド配列。
- (2) 少なくとも第2図に示すアミノ配列の277~577のコラーゲン結合部分を含む、特許請求の範囲第1項記載のポリペプチド。
- (3) 少なくとも第2図に示すコラーゲン結合アミノ酸配列379~445を含む、特許請求の範囲第1項記載のポリペプチド。
- (4) 少なくとも第2図に示すアミノ酸配列21~241のファイブリン結合部分を含む、特許請求の範囲第1項記載のポリペプチド。
- (5) ファイブロネクチンに存在しないポリペプチドに結合した、特許請求の範囲第1項から第4項の

いずれか1項に記載のポリペプチド。

- (6) 物質の精製方法において、その物質とファイブロネクチンのコラーゲン結合部分との複合体を固定化コラーゲンと接触させ、この複合体をこのコラーゲンに結合させ、次に複合体を溶解することを特徴とする、上記方法。
- (7) 溶解複合体を次に開裂してコラーゲン結合部分を除去し、次にこの物質を単離する、特許請求の範囲第6項記載の方法。
- (8) 治療剤と結合したファイブリン結合アミノ酸配列を含む、特許請求の範囲第1項又は第4項に記載のポリペプチド。
- (9) コラーゲンおよび/又はファイブリンに対し特異的親和性を有するファイブロネクチンのポリペプチド配列をコードする cDNA 配列。
- (10) 第3b図の1147~1351に示す構造を有する、特許請求の範囲第9項記載の cDNA 配列。
- (11) 第3a図の73~738に示す構造を有する、特許請求の範囲第9項記載の cDNA 配列。
- (12) 特許請求の範囲第9項から第11項のいずれ

か1項に規定したcDNA配列を含むプラスミド又は他のベクター。

03 特許請求の範囲第12項に特許請求したベクターを包含することにより修飾した微生物。

04 特許請求の範囲第12項に特許請求したベクターを包含することにより修飾した Escherichia coli。

3. 発明の詳細な説明

フィブロネクテン (FNs) は細胞の付着性および拡散、細胞の移動、細胞の形態制御、分化および腫瘍遺伝子の形質転換のような脊椎動物の各種接合方法に達となる役割を有する一種の高分子量グリコタンパクを構成する。すべてのこれらの生物学的活性はFNと細胞およびFNと細胞外物質の相互作用を意味する。コラーゲン、ヘパリン、フィブリン、細胞表面、細胞およびDNAに対する結合活性はFN分子のそれぞれ異なる領域にある (出説に対してはヤマダ、1983参照)。

FNは機能的にも、構造的にももつとも多面的既知タンパクの1つである。FN分子は通例相似す

さ (Skorstengaardら、1982; Petersenら、1983)]。この基本的フィブロネクテン構造の変化は細胞質および血漿フィブロネクテン間の差異および両形のポリペプチド鎖間の差異をも説明する。フィブロネクテンの多様形は第二の (alternative) スプライシングを遂げた通常の前駆体に1個の遺伝子を転写することにより生ずるように思われる (Vibe-Pedersenら、1984)。今日までこのタイプの変化が起こる少なくとも2つの領域が記載されている。あるヒトのセルラインでは (繊維芽細胞、Hs 578T) FN mRNA は正確に相同タイプⅢの1つをコード化する270ニュークレオチド部分 (ED) により区別することができる。このED部分は血漿FNの起源である肝細胞 mRNA に存在しないようである (Kornblihttら、1983、1984b)。Schwarzbauerら (1983) はED領域タンパクの3'カルボキシ末端側部に位置する区域 (ⅢCS) で異なるラット肝臓の第二のスプライシングにより生ずる3つの異なるFN mRNA を報告した。異なる配列は既知内部相

るが、同一ではない分子量 $\approx 250,000$ のポリペプチドの二量体である。細胞FNは繊維芽細胞および他の細胞タイプの細胞外マトリックスの細胞成分に見出される。血漿FNは血漿に高濃度で (300 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 含まれる可溶性分子で、恐らくはオプソニン作用、創傷の癒合および止血 (ヤマダ、1983; Hynes & Yamada、1982) に含まれるものであろう。部分的な一次構造データは2個のFN形間および異なる種からのFNのうちの双方に高保持アミノ酸配列を示した: 牛の血漿 (Petersenら、1983)、牛の細胞質 (Kornblihttら、1983)、ヒトの血漿 (Pande & Shively 1982; Garcia-Pardoら、1983)、ヒトの細胞質 (Kornblihttら、1983、1984a; Oldbergら、1983)、ラットの血漿 (Schwarzbauerら、1983)。これらのデータは基本的FNポリペプチドは3つの異なるタイプのC部反復を含むことを確認するのに役立つ (牛血漿FNに最初に示されるように相同タイプI、IIおよびIII、それぞれ約40、60および90個のアミノ酸の長

同のいずれにも属さず、最後の2つのタイプIII相同反復間に、末端COOHの近くに挿入される。さらに梅沢ら (1985) はヒト肝臓FN mRNAの等しいⅢCS区域に、この区域に対し全体を5のモチーフに導く別の変化を報告した。FNポリペプチド間に認められる差異はpre-mRNAの少なくとも2つの特殊領域における第二のスプライシングに基づく (Tamkunら、1984; Vibe-Pedersenら、1984; 梅沢ら、1985) 内部一次配列の変化の結果である (Kornblihttら、1984a、1984b; Schwarzbauerら、1983)。

成人ヒトFNポリペプチドの完全なアミノ酸配列は下記複数のcDNAクローンのニュークレオチド配列から決定されるようになった。ポリペプチドの長さは内部に別のスプライシングが起こることにより2146~2325アミノ酸に変化する。

本発明はフィブロネクテン分子の任意の所望部分、特にその他のものとは別のフィブロネクテンの各結合活性を有するポリペプチドを供すること

ができる。第2図ではFNアミノ酸配列の各部分の結合部位が示される。これらのいくつかのものは既知であるが、ヒトコラーゲン結合部位の配列は新しい(図のライン8~13)。タイプⅡ相同を含むライン9および10は特別の意義を有し、コラーゲン結合能の大部分又はすべてを含むと信じられる。

本発明は第2図に示す277~577のアミノ酸配列を実質的に有し、又はコラーゲン結合能を有するその任意の連続部分、特に379~445の配列を有する新規ポリペプチドを提供する。実際にこのようなポリペプチドはフィブロネクタン分子自体の付加的残基を含む、コラーゲン結合ポリペプチドの所望の末端使用に影響しないさらに別のアミノ酸残基に結合することができる。

同様にフィブロネクタン分子の他の配列は他の分子に結合するこれらの能力に対し利用できる。第2図に示すように21~241のポリペプチド配列はフィブリン、ヘパリンおよび Staphylococcus aureus に対する結合に連結する。示されるように

記載するクローンおよび同様のクローンは E. coli 並びに他の適当な微生物に発現することにより相当するポリペプチドの製造に使用できる。pFH 134およびpFH 16はフィブロネクタン分子のコラーゲン結合部分に対するDNA配列を含み、フィブロネクタンのコラーゲン結合活性を有し、他の結合親和性を有しないポリペプチドを生成するために使用できる。pFH 6はポリペプチド結合フィブリンおよびヘパリンの発現に対しコンピテント E. coli を形質変換するために使用することができる。

クローン pFH 54、pFH 134およびpFH 16を得る方法は下記する。引用方法の反復により本質的に同一か又は僅かに異なる実用性を有する同様のクローンが得られるであろう。これに関連して適当な起源、すなわち所望のタンパク質又はポリペプチドをもともと発現できる細胞からの全細胞質RNAを使用する有用なcDNAの単離は現在利用できる技術を使用し、特に本明細書における場合のように所望タンパク質又はポリペプチドの実験のアミ

ノ酸配列はDNA、細胞および別のヘパリンおよびフィブリン結合部位に対する結合に連結する。

新規ポリペプチドはポリペプチドをコードし、代謝産物からポリペプチドを分離する内在DNAを含む細胞を培養することにより製造できる。適当なDNA配列は E. coli 又は他の微生物、例えば Saccharomyces cerevisiae のような酵母のコンピテント株をクローンすることができる。後者は培養され、次に所望のポリペプチドは培養生成物から単離される。第3図はフィブロネクタンおよび関連アミノ酸残基の完全なDNA配列を示し、これからフィブロネクタン分子の任意の所望部分の発現をクローニングするための所望のcDNA配列は容易に決定できる。

コラーゲン結合ポリペプチドをコードするDNA配列は1147配位~1351配位にあり、フィブリン結合ポリペプチドをコードする配列は73~738配位にある。

しかし、さらに詳細に本発明によれば、pFH 54、pFH 134、pFH 16およびpFH 6として

ノ酸配列および相当するDNA配列はいずれも既知である場合、当業者には日常的試験に属する事柄であることが認められるであろう。下記試験部分は有効であることがわかった適当な技術を記載するが、他の既知技術も同様に適用できることは予期されるであろう。試験者が入手しうる多数の材料から形質変換に対しRNA、ベクターおよびコンピテント微生物の適当な起源の同様の選択は当業者の通常技術内にある。

フィブロネクタンの所望のアミノ酸配列が形質変換微生物により発現される場合、微生物自体のポリペプチド特性と適合できることは認められるであろう。これはポリペプチドの意図的使用に対し重要ではないが、ある場合例えばポリペプチドが治療に使用される場合、付加的アミノ酸残基の存在は許容しえない。その場合ポリペプチドは例えばプロテアーゼにより付加的処理して望ましくない付加的アミノ酸残基を含まない所望のポリペプチドを分離しなければならない。

上記のように、本発明はコラーゲンおよび/又

はフィブリンに結合しうるポリペプチドを発現することができるように適当な微生物を形質変換する手段を供することによって特別の関心がある。コラーゲンに結合できるポリペプチドは例えば貴重なポリペプチドの複製増強を助けるために使用できる。コラーゲン結合ポリペプチドは別の関心のあるポリペプチドに結合する形で発現される場合、又はこのようなポリペプチドに単離後結合する場合、結合ポリペプチドは結合ゼラゲン（すなわちコラーゲン）カラム上で親和クロマトグラフィにより精製し、次に複製後所望のポリペプチドは例えば酵素加水分解によりコラーゲン結合ポリペプチドから分離できる。

フィブリンに結合できるポリペプチドは天然フィブリン、例えば血餅に対する治療剤を目標とする治療に使用できる。例えば、ポリペプチドに結合するフィブリン分解酵素は改良された血餅溶解性を有し、これはその目標に対する改良粘着性を有するからである。

図面において、第1図はヒトFN mRNAのポリ(A)

Ruoslahti, 1984)は強調される。位置17 (Ser)、21 (Cys) および42 (Val) は Garcia-Pardoら (1983) によりそれぞれCys, Ser およびAlaとして報告される。この図に示されるFNポリペプチドは分子量=255,905を有する2325残基を有する。炭水化物側鎖を有し、9%のタンパクマスであると評価される (Yamada, 1983) マスが添加される場合このFNポリペプチドの分子量は約279,000に増加するであろう。この数字はSDS-PAGEにより評価されるFNモノマーの分子量(230-250,000)よりかなり高いと思われる。これはその範囲の適当なタンパク標準物の不足と共に高分子量タンパクの範囲におけるSDSゲルの貧弱な分解により説明できるであろう。

記号は次の通りである：—、遊離SH基；△、炭水化物側鎖部位；△、キモトリプシンの開裂部位；▲、プラスミンの開裂部位。複製のフィブロネクタンポリペプチドはライン26および30の別のスプライス領域のすべての可能な順列により生成

尾部から7692ニュークレオチドをカバーする7つのcDNAクローンの制限酵素マップを示す。ヒトFN mRNAは7900ニュークレオチドの長さであると思われる (Kornblithら, 1985)。クローンは成熟タンパク (下図は結合部位を示す) に対する完全なコード領域および5'非コード領域をカバーする。点線は相当するcDNAクローンに存在しない部分を示すが、これは最初のストランドcDNA反応で合成されなければならない。そしてこれはクレノウ酵素の不足の結果として失われ、二次cDNAストランドを完結させる。マップの数字は塩基対にある。

第2図はヒトFNポリペプチドの完全なアミノ酸配列を示す。残基1および2325は成熟タンパクのNH₂ および末端COOHである。配列は第1図描写のcDNAクローンのニュークレオチド配列 (第3図参照) から推定される。線列は内部相同を示す。ギャップは相同を最高化するために導入された。1タイプの相同内の同一残基は枠組みされる。細胞認識テトラペプチドRQDS (Pierschbacher &

させることができる (下記説明)。

第3図は第1図のcDNAクローンの配列から推定した第2図のヒトFNポリペプチドの完全なニュークレオチド配列を示す。

第4図はFN一次構造の変化を示す。Aは成熟タンパクの完全な構造である。黒ぬり枠はタイプI相同であり、斜線枠はタイプII相同であり、白枠はタイプIII相同である。BおよびCは3'領域 (C) で認められる複製FN mRNAの翻訳により生じうる異なるFNポリペプチドを示す。相当するコード化mRNA塩基を囲むcDNAクローンの名称は各ポリペプチドの右側に示される。△は接合を示す。1r1+2はラットの肝臓cDNAライブラリから (Schwarzbauerら, 1983)、pPHL1および8はヒト肝臓cDNAライブラリから、およびpFH1はHs 578 TセルラインcDNAライブラリから (Kornblithら, 1983) 単離された。すべての変化はコラーゲンおよびフィブリンに結合する領域を含むことは注目される。

第5図は第1図よりさらに詳細にコラーゲン結

合領域の位置および内部相同 (I、II および III) を示すフィブロネクチンタン白の部分を示す。下記細菌発現試験において使用される cDNA 系列の位置および大きさ (塩基対における) が下記される。cDNA pXFN 1~8 に関連する制限酵素部位の位置が示される。pFH 134 および pFH 16 の両部 Hind III および Bam HI 部位はベクターのポリリンカーに存在する。

第1図はヒト FN mRNA の成熟タン白に対する3'非コード領域および完全コード領域をカバーする異なる cDNA クローンの制限マップを示す。クローン pFH I、pFH II および pFH 154 の単離は上記した (Kornblith ら、1983、1984 a)、そして後者のニュークレオチド配列および推定アミノ酸配列は以前公開された (Kornblith ら、1984 b)。クローン pFH 54、pFH 134、pFH 16 および pFH 6 は新規である。図の5'の⁺をカバーするこれら4つの cDNA クローンの単離はオリゴニュークレオチドプライマーの合成を含んだ。プライマーの配列 (すなわち、

連結ストランドである。NH₂- から COOH- 末端に、FN は1つの20残基の長さの NH₂- 末端部分 (第2図ライン1)、5 ユニットのタイプ I 相同又はフィンガー (ライン2~6)、1つの連結ストランド (ライン7)、1つのフィンガー (ライン8)、2 ユニットのタイプ II 相同 (ライン9 および 10)、3つのフィンガー (ライン11、12 および 13)、1 ユニットのタイプ III 相同 (ライン14)、1つの連結ストランド (ライン15)、14 ユニットのタイプ III 相同 (ライン16~29、ED ポリペプチドを含む)、1つの連結ストランド (III CS、ライン30)、1 ユニットのタイプ III 相同 (ライン31)、1連結ストランド (ライン32)、3 フィンガー (ライン33、34 および 35) および COOH- 末端部分 (ライン36) により形成される。

FN の一次構造は順序のレベルおよび任意の他のタン白に以前に見られない複雑さを反映する。16 ユニットのタイプ III 相同の配列における対称性は特に興味がある。2 ユニットのタイプ III (第

5-⁺CTGAAACCATTTCTGTAAC) はクローン pFH 154 の5'の端に近い領域の mRNA 配列を相補するものであつた。オリゴニュークレオチドは He 578 T 細胞からの全 RNA の最初の逆転写に使用し (Hackett ら、1977) および cDNA ライブラリは下記のように調製した。クローン pFH 54、pFH 134、pFH 6 および pFH 16 はさらに分析するため選択された。これらのクローンの完全なニュークレオチド配列は測定され、7692 bp から成り、そのうちの6972 bp はコード領域に、720 bp は3'非翻訳領域およびポリ (A) 尾部に相当する。配列は第3図に示す FN の完全 DNA 配列に含まれる。

第1図のクローンのニュークレオチド配列から推定されるヒトフィブロネクチンのアミノ酸配列は第2図に示される。第2図の線列は内部相同を最高化する。完全な FN 鎖は3つの異なるタイプの内部相同 (タイプ I、II および III) を有する区域および分子内に同族対応を有しない区域を供する。後者は NH₂ 端末および COOH 端末部分および内部

2図、ライン14 および 31) は並列方法で残りの14を有する中心ブロックから連結ストランド (ライン15 および 30) により分離される。タイプ II ユニット内の相同度は非常に高い。3つの残基はすべてのユニット、すなわち Trp (第2図、上部の残基599を有する枠部分)、Leu (上部の残基640を有する枠部分) および Tyr (上部の残基646を有する枠部分) に保持される。保持残基は非相同の谷により分離された Trp および Tyr の周囲の2個のピークに分配される。タイプ III 配列の順序および保持の度合いは FN の中心領域の二次構造の特別の拘束を反映しなければならぬ。この領域はジサルフアイド橋により安定化されない。それはタイプ III 配列に含まれる (第2図の位置1201 および 2075) 僅か2個の Cys 残基が還元形で存在することが示されたからである (Vibe-Pedersen ら、1982; Smith ら、1982)。

いくつかの結合活性は FN 分子の異なる領域に割当てられた (第1図および第2図参照)。しかし、

細胞結合能力の場合においてのみ、実際の結合部位が今までに確認された。実際に Pierschbacher および Ruoslahti (1984) はテトラペプチド Arg-Oly-Asp-Ser (RODS) は FN の細胞付着活性の原因となることを実証した。このテトラペプチドは1つのタイプⅢユニット内の1493~1496位置で第2図の配列に唯一度だけ存在する。第2図はこの区域のタイプⅢ配列の最連続列は、テトラペプチドが特別の要素であると考えられる場合にのみ得られ、タイプⅢユニットの残りの相当する領域に4つのギャップを与えることも示す。細胞結合部位と同様にタイプⅢ配列内の他の結合部位又は生物学的活性は非保持ストレッチに存することは確かなようである。他のテトラペプチドは細胞付着活性を示すフィブリノーゲンのα鎖を含む他のタン白 (Pierschbacher & Ruoslahti, 1984) にも見出された。

FN 遺伝子発現の重要な特徴は通常の mRNA 前駆体の分化プロセッシングによる僅かに異なるポリペプチドの生成である (Vibe-Pedersen ら、1984)。

子のこれらの生物学的活性部位間の距離は FN 機能に対し臨界的である。例えば、血漿 FN は形態および序列を形質変換繊維芽細胞セルラインに復帰するのに細胞質フィブロネクテンより活性の低い1~2オーダーの大きさである (Yamada & Kennedy, 1979)。さらに ED 部分を有する mRNA は繊維芽細胞に存在する (細胞質 FN の1起源) が、肝細胞には存在しない (血漿 FN の1起源) (Kornblitt ら、1984b)。ED の機能は細胞結合テトラペプチドおよびヘパリン結合部位間の距離を増加させることで、細胞質 FN 分子の結合活性を増強することになる。

試 験

RNA 調製

ヒトセルライン Hs 578 T (Hackett ら、1977) を10%牛胎児血清を含む Dulbecco 修正 Eagle 培地で培養した。総 RNA をグアニジン-HCl 法により集密的細胞単層から抽出した (Chirgwin ら、1979)。2~4 時間の総 RNA を 4×10^8 細胞から抽出した。

第4図 A は FN 分子に付着して今まで認められた可変性の2つの領域の局限化を図で示す (Schwarzbauer ら、1983; Kornblitt ら、1984a, 1984b)。第4図 B および C は ED (第2図、ライン26) およびⅢCS (第2図、ライン30) 領域でそれぞれ生成する異なる mRNA の翻訳により生じるポリペプチドのタイプを示す。この図はヒトおよびラット双方のフィブロネクテンに対しなされた観察を組み合せる。少なくとも10の異なる FN ポリペプチドは ED およびⅢCS 部分間のすべての順列が可能であると仮定する場合1個の遺伝子から生成することができる。これは生体内に見出された細胞質および血漿 FN の二次元のゲル電気泳動分析で認められた FN ポリペプチド不均質性と一致する。同種又は異種二量体 FN 分子は FN ポリペプチドプールから形成することができる。この複合状態の生物学的意義は尚明らかではない。しかし ED およびⅢCS の変換領域は細胞-ヘパリンおよびヘパリン-フィブリリン結合部位間に介在することは注目されることである。ナ

RNA の他の起源は好ましい場合、例えば繊維芽細胞又は肝細胞を使用できる。

フィブロネクテン cDNA クローンの単離

第1図に描写したすべての cDNA クローンは筋型として Hs 578 T 細胞 RNA を使用して得た。オリゴニュークレオチドプローブによるクローン pFH 1 の単離は Kornblitt ら (1983) により記載された。クローン pFH 111 および pFH 154 の「mRNA 歩行 (walking)」[オリゴニュークレオチドプライミング (priming)] による単離は Kornblitt ら (1984a) により記載された。この最後の手順は新規クローン pFH 54、pFH 134、pFH 16 および pFH 6 の単離に使用された。pFH 154 の5'末端に近接する mRNA 領域に相補的なオリゴニュークレオチドプライマーは Oait ら (1980) の方法により合成された。オリゴニュークレオチドは Hs 578 T 細胞からの総 RNA のプライム逆転写に使用された (Hackett ら、1977)。プラント末端 ds cDNA は調製され、上記のように *E. coli* MC1061 (Korn-

hlhltら、1983)のプラスミドpAT153 / Pvu II / B (Ansonら、1984)にクローンされた。コロニーは一溝でファイリングすることによりラベルされた、プライマー配列を欠くpFH 154の5'末端からの制限断片をプローブとして使用してスクリーニングした。この方法で、クローンpFH 54およびpFH 134が得られた。第2工程ではクローンpFP 16および6がクローンpFH 134の5'末端に対する末端ラベルプローブによりスクリーニングすることにより得られた。

フィブロネクテンcDNAの制限断片はDNAポリメラーゼIのクレノウ断片を満たし、そしてSma Iカット/ホスファターゼ処理pEX 1、2又は3ベクターにプラント末端を連結した。形質変換はカナマイシン耐性を特定し、c1857対立遺伝子を有するプラスミドpc1857 (Remautら、1983)を含むE. coli 株L K III (Zabeauら、1982)を使用して行なつた。コロニーはMatsman 541濾紙に移し (Gergenら、1985)、5'末端ラベル (Maxamら、1977)又はニック

錯誤プローブ (Rigbyら、1977)のいずれかによりスクリーンされた。

配列の決定

クローンからのインサートはアガロースゲル電気泳動で分離され、電気泳動により回収された (Girwitzら、1980)ベクターDNAから適当な制限酵素で消化することにより除去された。大部分の配列はMaxamおよびGilbert (1980)の化学的分解処理により行なわれた。いくつかの領域は連鎖ターミネータ法 (Sangerら、1977)により配列された。この目的に対し、関連断片は単離され、Alu I又はHae IIIのいずれかにより消化され、そのサーキュラー化を阻止するために子牛ホスファターゼにより予め処理されたSma I消化M13mp9ベクターに連結された (Messing & Vieira, 1982)。連結混合物はコンピテントE. coli JM101を形質変換するために使用され、再結合物は β -ガラクトシダーゼ遺伝子のインサート不活性化により透明プラークとして選択された (Messingら、1981)。1個のコスト

ランドDNAは標準手前により製造され (Winter & Fields, 1980)、インサートは「万能的」17-ニュークレンオチドのプライマーを使用して配列された (Duckworthら、1981)。

細胞抽出物の製造

再結合プラスミドを有する細菌は30℃で2 $\frac{1}{2}$ 時間生長させ、cro/ β -ガラクトシダーゼ融合タンパクの発現は2時間42℃に変えることにより誘導した。細菌は1200gのペレットにし、50ミリモルトリスHCl、pH 7.4、170ミリモルNaClにより洗脱した。細胞はリゾチーム (2.5mg/ml)を含む同じ緩衝液に再懸濁し、2分間氷上で音波処理した。分解物は4℃で30分、45,000gで遠心分離した。ペレットは10ミリモルトリスHCl中の7モル尿素、pH 7.4、1ミリモルEDTA中に再懸濁し、30分室温でインキュベートした。可溶性抽出物は4℃で50ミリモルトリスHCl pH 7.4に対し広く透析し、次に4℃で30分、45,000gで遠心分離した。

ゼラチン-セファロース クロマトグラフィ

ゼラチン-セファロースはSigma Chemicals (St. Louis, Mo, USA)から得るか、又はゼラチン (豚皮タイプI, Sigma Chemicals)をCNBr-活性化セファロースCL 4B (Pharmacia, Uppsala, Sweden)に結合させることにより製造した。ゼラチン-セファロース上の細胞抽出物のクロマトグラフィはRuoslahtiら (1982)による記載のように行なつた。ゼラチン-セファロースマトリックスの効力は猪鬃ヒト血漿フィブロネクテン (Sigma Chemicals)に使用して立証された。

電気泳動分析

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を7.5% (w/v)アクリルアミドスラブゲル (19)上でトリス/グリシン緩衝液中の0.1% (w/v) SDSで行なつた。ゲルはメタノール/水/酢酸 (4:5:1、容積で)中の0.1%クーマシーブルーで染色した。イムノブロッティングはTowbinら (1979)による記載のように行なつた。電気泳動によりニトロセルロースに移動したポリペ

ブナドはウサギ抗(ヒト血漿フィブロネクチン)血清(1:500、ホスファート緩衝塩水、10%新生子牛血清および0.05%ツイーン20中で)によりブロープされた。結合免疫グロブリンはアルカリ性ホスファターゼ結合山羊抗-(ウサギ-IgG)(1:1000; Sigma Chemicals)を使用して可視化した。

タンパク分析

タンパクは標準として牛血清アルブミンを使用し、Bradford法(1976)により評価した。

フィブロネクチン発現プラスミドの構造および特性表示

ヒトフィブロネクチン cDNA クローンの pFH 134 および pFH 16 はタンパクのタンパク分解開裂により確認されたフィブロネクチンのコラーゲン結合領域のすべて又は一部を包含する(第1図および第5図参照)。従ってこれらの cDNA は *E. coli* の機能的コラーゲン結合部位の発現を研究するため出発点として選択された。クローニングに対し使用される pEX ベクターは外因性遺伝子配列を λ Pr

子とポリペプチドの生産を示した。pXFH 134 および pXFH 16 のフィブロネクチン配列の正しい配向は制限酵素分析により確認された。

pXFH 134 および pXFH 16 により生産された融合タンパクはこのベクターシステムに対し既報文と一致する約20%の全細菌タンパクを証明した(Stanley ら、1984)。両融合タンパク、特に pXFH 134 ポリペプチドはいくらかのタンパク分解を示し、これは野生タイプの cro/β -ガラクトシダーゼ(116 KD)の大きさに部分開裂されるらしい。誘導期間(0~120分)に合成されたタンパクの分析はタンパク分解が融合タンパクの合成に付随して起つたことを示した。

pXFH 134 および pXFH 16 のフィブロネクチン抗原決定基の発現はウサギポリクローナル抗-(ヒト血漿フィブロネクチン)血清を使用してイムノブロットイングにより研究された。抗血清は pXFH 134 により合成された185 KD ポリペプチドと反応するが、pXFH 16 融合タンパク又は cro/β -ガラクトシダーゼポリペプチドとは反応し

プロモーターの調度下に cro -LacZ ハイブリッド遺伝子の3'末端ですべての3つの読み枠のポリリンカーにインサートすることができる(Stanley ら、1984)。pFH 134 および pFH 16 の1.74 Kb および1.04 Kb インサートの5'末端は cDNA および pEX 2 の Sma I 部位にクローン化されるプラント末端の読み枠を確認するために配列された(Maxam ら、1980)。再結合プラスミドは温度感受性 λ Pr リプレッサー、c1857 をコード化するプラスミドにより予め形質変換された *E. coli* 株に導入された。これは cro/β -ガラクトシダーゼタンパクの温度誘導性発現を考慮する。発現構造体によるフィブロネクチン融合タンパクの生産を試験するためにハイブリッド形成能性のクローンを30℃で2 $\frac{1}{2}$ 時間生長させ、次にさらに2時間42℃に変えた。総細菌分解物を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析した。 $\frac{5}{10}$ の pXFH 134 構造体および $\frac{1}{10}$ pXFH 16 構造体は cDNA インサートの長さ(~185 KD および ~165 KD、それぞれ)と一致する大きさの帯分

ない。これは抗血清により認識されるエピトープはタイプ II 相同ユニットおよび隣接するタイプ I リピートの外側にあることを示す(第5図)。この観察は既報(Ruoslahti ら、1979)のヒトフィブロネクチンのコラーゲン結合領域の弱い抗原性と一致し、十中八九はこの領域における非常に高レベルのアミノ酸保持を反映するものである(第2図)。

ゼラチン-セファロース親和クロマトグラフィー

E. coli の β -ガラクトシダーゼ融合の過生産は不溶性混合体として細胞にタンパクの沈澱を生ずる(Williams ら、1982; Cheng 1983; Stanley 1983)。pXFH 134 プラスミドを発現する細菌が音波処理により分解され、遠心分離される場合、フィブロネクチン融合タンパクは不溶性ペレットにもつばら見出された。このフラクションは細菌分解物の全タンパクの約50%を装わした。この材料の可溶性は7M 尿素による処理およびその後透析を要し、60%のタンパクが溶液中に残った。融合タンパク中に非常に強化されたこのフ

ラタンロンは50ミリモルトリスHCl、pH 7.4中で平衡化された5%のゼラチン-セファロースカラムに直接適用された。カラムは流速のE₂₈₀が0.01になるまで50ミリモルトリスHCl、pH 7.4中の0.5モルNaClにより洗脱した。cro/β-ガラクトシダーゼフィブロネクテンハイブリドタン白は同じ緩衝液中の4モル尿素により1つの対称ピークとしてカラムから溶離された。これらの条件下でフィブロネクテンはゼラチン-セファロースから特定の溶離される(Ruoslahtiら、1982)。pEX 2のみを使用する対照試験では、野生タイプのcro/β-ガラクトシダーゼタン白の結合は全く認められなかった。

機能的コラーゲン結合部位は従つてpXFN 134融合タン白中で再構成された。しかし、特定の溶離カラムから溶離される融合タン白はカラムに適用された融合タン白の<5%を表わした。こうして細菌細胞中の融合タン白の不溶化によりかなりの活性が失われることは意外なことではない。その後これらを再溶解するために烈しい処理が必要

pXFN 4	-
pXFN 5	-
pXFN 6	+
pXFN 7	-
pXFN 8	-
pEX ₂ ベクターのみ	-

pXFN 34の結合活性は2つのタイプⅡ相同ユニットから成る構造物によりほとんど完全に説明される(pXFN 3)。pXFN 3およびpXFN 6(双方共活性)とpXFN 5およびpXFN 8(双方共不活性)を比較することにより、結合に対し塩基的のアミノ酸結合はpXFN 3のフィブロネクテン断片の半分のC-末端にあり、さらに詳細にはHinf I(第3図の配位1147)からRsa I部位(第3図の配位1351)にあると推定できる。この66アミノ酸配列はフィブロネクテンのほとんど全体の第2のタイプⅡ相同ユニットプラス隣接タイプⅠ相同ユニットの少数のアミノ酸を含む(第2図参照)。

である。

pXFN 16により生産されるフィブロネクテン融合タン白もゼラチン結合に対し試験がなされ、pXFN 134と同様の活性を示した。これはコラーゲン結合領域がタン白レベルの規定領域内に存在し、2つのタイプⅡおよび隣接するタイプⅠ相同ユニットに強く関係することを示した(第5図参照)。さらに結合部位を局限するために一連の重複表現構造物をpXFN 16から製造し(第5図)、ゼラチン結合活性を系統的に分析した。結果は表1に要約し、タイプⅡ相同ユニットの一貫した関連性を示す(pXFN 2、3および6)。

表 1

pEX 構造物	ゼラチン-セファロースに対する結合
pXFN 134	+
pXFN 16	+
pXFN 1	-
pXFN 2	+
pXFN 3	+

引用文献

- Anson, D., Choo, K. H., Rees, D. J. G., Giannelli, P.,
 Gould, K., Huddleston, J. A. and Brownlee, G. G.
 (1984) EMBO J. 3, 1053-1064.
 Bradford M. (1976), Anal. Biochem., 72, 248-254.
 Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J. and
 Rutter, W. J. (1979) Biochemistry 18, 5294-5299.
 Cheng Y. (1983), Biochem. Biophys. Res. Commun.,
111, 104-111.
 Duckworth, M. L., Calt, M. J., Goelet, P., Hong,

- G.P., Singh, M. and Titmas, R.C. (1981) Nucl.Acids Res. 9, 1691-1706.
- Galt, H.J. et al (1980) Nucl.Acids Res. 8, 1081-1096.
- Garcia-Pardo, A., Pearlstein, E. and Frangione, B. (1983) J.Biol.Chem. 258, 12670-12674.
- Gergen J.P., Stern R.H., and Hersink P.C. (1979), Nucl.Acids Res. 7, 2115-2136.
- Girwitz, S.C., Bacchetti, S., Rainbow, A.J. and Graham, F.L. (1980) Anal. Biochem. 106, 492-496.
- Hackett, A.J., Smith, H.S., Springer, E.L., Owens, R.B., Nelson-Rees, W.A., Riggs, J.L. and Gardner, M.B. (1977) J.Natl.Cancer Inst. 58, 1795-1800.
- Hynes, R.O. and Yamada, K.M. (1982) J.Cell.Biol. 95, 369-377.
- Kornblihtt, A.R., Vibe-Pedersen, K. and Baralle, F.E. (1983) Proc. Natl. Acad.Sci.USA 80, 3218-3222.
- Kornblihtt, A.R., Vibe-Pedersen, K. and Baralle, F.E. (1984a) EMBO J. 3, 221-226.
- Kornblihtt, A.R., Vibe-Pedersen, K. and Baralle, J.E., and Engvall E., (1979), J.Biol.Chem. 254, 6054-6059.
- Ruoslahti, E., Hayman E.G., Piersbacher M., and Engvall E. (1982), Meth. Enzymol. 92, 803-831.
- Sanquer, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74, 5463-5467.
- Schwarzbauer, J.E., Tamkun, J.W., Lemischka, I.R. and Hynes, R.O. (1983) Cell 35, 421-431.
- Skorstengaard, K., Thøgersen, H.C., Vibe-Pedersen, K., Petersen, T.E. and Magnusson, S., (1982) Eur.J.Biochem. 128, 605-623.
- Smith, D.G., Mosher, D.F., Johnson, R.B. and Furcht, L.T. (1982) J.Biol. Chem. 257, 5831-5833.
- Stanley K.K. (1983), Nucl. Acids Res. 11, 4077-4092.
- Stanley K.K. and Luzzio, P. (1984) EMBO J. 3, 1429-1434.
- Tamkun, J.K., Schwarzbauer, J.E. and Hynes, R.O. (1984) Proc.Natl. Acad. Sci.USA 81, 5140-5144.
- Towbin H., Staehlin T. and Gordon J. (1979), Proc.Natl. Acad. Sci.U.S.A., 76, 4350-4354.
- Umezawa, K., Kornblihtt, A.R. and Baralle, F.E. (1985) submitted to FEBS Lett.
- F.E. (1984b) Nucl.Acids Res. 12, 5853-5869.
- Maxam, A.M. and Gilbert, W. (1977) Proc. Natl.Acad. Sci. U.S.A. 74, 560-569.
- Maxam, A.M. and Gilbert, W. (1980) Meth.Enzym. 65, 499-580.
- Messing, J. and Vieira, J. (1982) Gene 19, 269-276.
- Messing, J., Crea, R. and Seeburg, P.H. (1981) Nucl.Acids Res. 9, 309-321.
- Oldberg, A., Linney, E. and Ruoslahti, E. (1983) J.Biol.Chem. 258, 10193-10196.
- Pande, H. and Shively, J.E. (1982) Arch.Biochem. Biophys. 213, 250-265.
- Petersen, T., Thøgersen, H.C., Skorstengaard, K., Vibe-Pedersen, K., Sahl, P., Sottrup-Jensen, L. and Magnusson, S. (1983) Proc.Natl.Acad. Sci.USA 80, 137-141.
- Pierschbacher, M.D. and Ruoslahti, E. (1984) Nature 309, 30-33.
- Remaut E., Tsao H, and Fiers W. (1983) Gene, 22, 103-113.
- Rigby P.W.J., Dieckmann H. Rhodes C., and Berg P. (1977) J.Mol. Biol. 113, 237-251.
- Ruoslahti, E., Hayman, E.G., Kinnasla P., Shively Vibe-Pedersen, K., Sahl, P., Skorstengaard, K. and Petersen, T.E. (1982) FEBS Lett. 142, 27-30.
- Vibe-Pedersen, K., Kornblihtt, A.R. and Baralle, F.E. (1984) EMBO J. 3, 2511-2516.
- Williams D.C., Van Frank R.M., Muth W.L. and Burnett J.P. (1982), Science 215, 687-689.
- Winter, G. and Fields, S. (1980) Nucl.Acids Res. 8, 1965-1974.
- Yamada, K.M. and Kennedy, D.W. (1979) J.Cell.Biol. 80, 492-498.
- Yamada, K.M. (1983) Ann.Rev.Biochem. 52, 761-799.
- Zabeau M. and Stanley K.K. (1982) EMBO J., 1, 1217-1224.

代理人 横 村 隆

Fig. 2. (continued)

[illegible]

Fig. 2. (continued)

[illegible]

Fig. 3e.

E E D V A E L S I S P S D N A V V L T N L L P G T E T V V S V S S / T E D H E S
 15AGSAAAGAT3TTGAGAGT3TCAATTCTCTTCAGACAAATGCAATGGTCTTAAACAAATCTCTGCTG3TACAGAAAT3TAGTGAGT3TCTCCAGTGTCTAC3AACAACATGAGAG
 3850 3860 3870 3880 3890 3900 3910 3920 3930 3940 3950 3960

23
 T P L R O R O K T G L D S P T G I D F S D I T A N S F T V H W I A P R A T I T G
 CACACCTCTTAGAGGAAGACAGAAACAGGTCTTGAATCCCAACTGGCAATTGACTTTCTGATATTACTGCCAACTCTTTACTGTGCACTGGATTTGCTCCGAGCCACCATCACTGG
 3970 3980 3990 4000 4010 4020 4030 4040 4050 4060 4070 4080

T R I R H H P E H F S O R P R E D R V P H S R N S I T L T N L T P G T E Y V V S
 CTACAGGATCCGCCATCATCCCGAGCACTTCAGTGGGAGACCTCGAGAAGATCGGGTCCCACTCTCGGAATCCATCACCCTCACCACCTCACTCCAGGCACAGATATGTGGTCAG
 4090 4100 4110 4120 4130 4140 4150 4160 4170 4180 4190 4200

24
 I V A L N G R E E S P L L I G O O S T V S D V P R D L E V V A A T P T S L L I S
 CATCGTGTCTTAATGGCAGAGGAAAGTCCCTTATTGATTGGCCAACATCAACAGTTTCTGATGTTCCGAGGACCTGGAGTTGTTGCTCGGACCCCAACAGCTACTGATCAG
 4210 4220 4230 4240 4250 4260 4270 4280 4290 4300 4310 4320

W D A P A V T V R Y Y R I T Y G E T G G N S P V O E F T V P G S K S T A T I S G
 CTGGGATGCTCTCTGTACAGTGAGATATTACAGGATCACTTACGAGAAACAGGAGGAAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACTGTGCTGGGAGCAAGTCTACAGTACCATCAGCGG
 4330 4340 4350 4360 4370 4380 4390 4400 4410 4420 4430 4440

25
 L K P G V D Y T I T V Y A V T G R G D S P A S S K P I S I N Y R T E I D K P S O
 CCTTAAACCTGGAGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGGCCGTGGAGACAGCCCGCAAGCAAGCAATTTCCATTAAATACCAACAGAAATGACAAACCATCCCA
 4450 4460 4470 4480 4490 4500 4510 4520 4530 4540 4550 4560

H O V T D V O D N S I S V K W L P S S S P V T G Y R V T T T P K N G P G P T K T
 GATGCAAGTGACCAATGTTTCAGGACAACAGCATTAGTGTCAAGTGGCTGCTTCAAGTTCCCTGTTACTGGTTACAGAGTAACCAACCACTCCCAAAATGGACCAAGGACCAACAAAAC
 4570 4580 4590 4600 4610 4620 4630 4640 4650 4660 4670 4680

K T A G P D O T E M T I E G L O P T V E Y V V S V Y A O N P S G E S O P L V O T
 TAAACTGCAGGTCAGATCAACAGAAATGACTATTGAAGCTTCAGCCCAAGTGGAGTATGTGGTTAGTGTCTATGCTCAGAAATCAACCCGAGAGAGTCAAGCTCTGCTTGCAGAC
 4690 4700 4710 4720 4730 4740 4750 4760 4770 4780 4790 4800

Fig. 3f.

26
 A Y T V I D R P K G L A F T D V D V D S I K I A W E S P O G O V S R Y R V T Y S
 T3CASTAACCAACATTTGATCGCCCTAAAGGACTGGCAATCACTGATGTGGATGTCCGATTCATCAAAATTTGCTTGGAAAGCCCAAGGGGCAAGTTTCAAGGTACAGGGTGACCTACTC
 4810 4820 4830 4840 4850 4860 4870 4880 4890 4900 4910 4920

S P E D G I H E L F P A P D G E E D T A E L O G L R P G S E Y T V S V V A L H D
 GAGCCCTGAGGATGGAATCCATGAGCTATTCCCTGCACCTGATGGTGAAGAAGACACTGCAGAGCTGCAAGGCCCTCAGACCCGGTTCTGAGTACACAGTCAGTGTGGTTGCTTGCACGA
 4930 4940 4950 4960 4970 4980 4990 5000 5010 5020 5030 5040

27
 D H E S O P L I G T O S T A I P A P T D L K F T O V T P T S L S A O W T P P H V
 TGATATGGAGGCCAGCCCTGATTGGAACCCAGTCCACAGCTATTCTGCACCAACTGACCTGAAGTTCACTCAGGTACACCCCAAGCCCTGAGCCGCCAGTGGACCAACCAATGT
 5050 5060 5070 5080 5090 5100 5110 5120 5130 5140 5150 5160

D L T G Y R V R V T P K E K T G P M K E I N L A P D S S S V V V S G L M V A T K
 TCAGCTCACTGGATATCGAGTCCGGTGAACCCCAAGGAGAAGACCCGACCAATGAAGAATAAAGCTTGTCTCTGACAGCTCATCCCTGGTTGTATCAGGACTTATGGTGGCCACCA
 5170 5180 5190 5200 5210 5220 5230 5240 5250 5260 5270 5280

28
 T E V S V Y A L K D T L T S R P A O G V V T T L E N V S P P R R A R V T D A T E
 ATATGAAGTGAGTGTCTA?GCTCTTAAGGACACTTTGACAAGCAGACCACTCAGGGTGTGTCAACCACTCTGGAGAAATGTAGCCCAACCAAGAGGGCTGCTGTGACAGATGCTACTGA
 5290 5300 5310 5320 5330 5340 5350 5360 5370 5380 5390 5400

T T I T I S W R T K T E T I T G F O V D A V P A N G O T P I O R T I K P D V R S
 GACCACCATCACCATTAGCTGGAGAACCAAGACTGAGACGATCACTGCGCTTCAAGTTGATGCCGTTCCAGCAATGGCCAGACTCCAATCCAGAGAACCATCAAGCCAGATGTGAGAAG
 5410 5420 5430 5440 5450 5460 5470 5480 5490 5500 5510 5520

29
 Y T I T G L O P G T D Y K I Y L Y T L N D N A R S S P V V I D A S T A I D A P S
 CTACACCATCACAGGTTTACAACCAAGGCACTGACTACAAGATCTACCTGTACACCTTGAATGACAATGCTCGGAGCTCCCTGTGGTCAATCGAGCCCTCCACTGCCATTGATGACCATC
 5530 5540 5550 5560 5570 5580 5590 5600 5610 5620 5630 5640

N L R F L A T T P N S L L V S W O P P R A R I T G Y I I K Y E K P G S P P R E V
 CAACCTCGGTTTCTCGGCCACCAACCAATTCCTTCTGGTATCATGGCAGCCGCCAGTCCAGGATTACCGGCTACATCATCAAGTATGAGAAGCCCTGGTCTCTCTCCACAGAAAT
 5650 5660 5670 5680 5690 5700 5710 5720 5730 5740 5750 5760

Fig. 3g.

V P R P R P 3 / T E A T I T O L E P O T E Y T I Y V I A L K N H O K S E P L I Q
 31*CCCTCGCCGCCCTGCTGTACAGAGGCTACTATTACTGGCGTGAACCGGGAACCGAATATACAAATTTATGTCAATGGCCCTGAAGAATAATCAGAAGAGCGGCCCTGATTGG
 5770 5780 5790 5800 5810 5820 5830 5840 5850 5860 5870 5880

30
 R K K T D E L P O L V T L P H P N L H G P E I L D V P S T Y O K T P F V T H P G
 AAGGAAAAGACAGACGAGGCTTCCCAACTGGTAACCGTTCCACACCCCAATCTTCATGGACAGAGATCTTGGATGTCTCTCCACAGTTCAAAAGACCCCTTTCGTACCCACCCCTGG
 5890 5900 5910 5920 5930 5940 5950 5960 5970 5980 5990 6000

Y D T G H G I O L P O T S G O O P S V G O O H I F E E H G F R R T T P P T T A T
 STATGACACTGGAAATGGTATTGAGCTTCCTGGCACTTCTGGTCAGCAACCCAGTGTGGGCAACAAATGATCTTTGAGGAACATGGTTTAGGGGGACACACCGGCCCAACCGCCAC
 6010 6020 6030 6040 6050 6060 6070 6080 6090 6100 6110 6120

31
 P I R H R P R P Y P P P H V G O E A L S O T T I S W A P F O D T S E Y I I S C H P
 CCCCATAAGGCATAGGCCAAGACCATACCGGCCAATGTAGGACAAGAGCTCTCTCTCAGACAACCATCTCATGGGCCCATTCAGGACACTTCTAGTACATCATTTTCATGTCTCC
 6130 6140 6150 6160 6170 6180 6190 6200 6210 6220 6230 6240

V G T D E E P L O F R V P G T S T S A T L T G L T R G A T Y N I I V E A L K D Q
 TGTGGCACTGATGAAGAACCTTACAGTTACAGGTTCTGGAACTTCTACCACTGCACTCTGACAGGCCCTCAGAGGTGCCACCTACAACATCATAGTGGAGGCACTGAAGACCA
 6250 6260 6270 6280 6290 6300 6310 6320 6330 6340 6350 6360

32
 O R H K V R E E V Y T V G N S V N E G L N O P T D D S C F D P Y T V S H Y A V G
 SCAGAGGCATAAGGTTCCGGAAGAGGTTGTACCGTGGGCAACTCTGTCAACGAAGGCTTGAACCAACCTACGGATGACTCGTCTTTCAGCCCTACACAGTTTCCCATATGCCGTTGG
 6370 6380 6390 6400 6410 6420 6430 6440 6450 6460 6470 6480

33
 D E W E R M S E S G F K L L C Q C L G F G S G H F R C D S S R W C H D N G V N Y
 AGATGAGTGGGAACCAATGTCTGAATCAGGCTTTAACTGTGTGCCAGTGCTTAGGCTTTGGAAGTGGTCAITTCAGATGTGATTCATCTAGATGGTCCATGACAATGGTGTGAACCTA
 6490 6500 6510 6520 6530 6540 6550 6560 6570 6580 6590 6600

34
 K I G E K V D R O G E N G O M H S C T C L G N G K G E F K C D P H E A T C Y D D
 CAAGATTGGAGAGAAGTGGGACCGTCAGGGAGAAAATGGCCAGATGATGAGCTGCACATGTCTTGGGAACGGAAAGGAGAATCAAGTGTGACCCTCATGAGGCAACGTGTACGATGA
 6610 6620 6630 6640 6650 6660 6670 6680 6690 6700 6710 6720

Fig. 3h.

3 K T Y H V G E O W O K E Y L G A I C S C T C F G G O R G W R C D N C R R P G G
 TCGGAAGACATACCACGTAGGAGAACAGTGGCAGAGGAATATCTCGGTGCCATTTCCTCTCCGACATGCTTTGGAGGCCAGGGGGCTGGCCCTGTGACAACTGCCGACAGCTGGGGG
 6730 6740 6750 6760 6770 6780 6790 6800 6810 6820 6830 6840

E P S P E G T T G O S Y N O Y S O R Y H O R T N T N V N C P I E C F M P L D V O
 TGAACCCAGTCCGGAAGGCACTACTGGCCAGTCTTACAACCACTATTCTCAGAGATACCATCAGAGAACCACTAAATGTAAATGCCCCAATGAGTGTCTTACGCTTTAGATGTACA
 6850 6860 6870 6880 6890 6900 6910 6920 6930 6940 6950 6960

A D R E D S R E
 CGCTGACAGAGAAGATTCCGAGAGTAATCATCTTTCCAATCCAGAGGAACAAGCATGTCTCTGCAAGATCCATCTAAACTGGAGTGATGTAGGACACCCAGCTTAGAGTCTCTC
 6970 6980 6990 7000 7010 7020 7030 7040 7050 7060 7070 7080

TTTCTTCTTAAGCCCTTTGCTCTGGAGGAAGTCTCCAGCTTCAGCTCAACTCACAGCTTCTCAAGCATCACCCCTGGGAGTTTCTCTAGGGTTTCTCATAAATGAGGGCTGCACAT
 7090 7100 7110 7120 7130 7140 7150 7160 7170 7180 7190 7200

CGCTGTCTGCTTCSAAGTATTCAATACCGCTCAGTATTTAAATGAAGTGATTTCAAGATTTGGTTGGGATCAATAGGAAAGCATATGCACCCAAACCAAGATGCAATGTTTGAAT
 7210 7220 7230 7240 7250 7260 7270 7280 7290 7300 7310 7320

GATATGACCAAAATTTAAGTAGGAAAGTCAACCAACACTTCTGCTTCACTTAAGTGTCTGGCCCGCAATACTGTAGGAACAAGCATGATCTTGTACTGTGATATTTAAATATCCA
 7330 7340 7350 7360 7370 7380 7390 7400 7410 7420 7430 7440

CAGTACTCACTTTTCCAATGATCCTAGTAATTCCTAGAAATATCTTCTCTTACCTGTTATTTATCAATTTTCCAGTATTTTATACGAAAAATGTATGAAAACTTAGT
 7450 7460 7470 7480 7490 7500 7510 7520 7530 7540 7550 7560

ATGCAGTGTGAAGAGGAATTTGGTATAATTATGGTGGGTGATTATTTTATACTGTATGTCCAAAGCTTTACTACTGTGGAAGACAACCTGTTTAAATAAAGATTACATTCACA
 7570 7580 7590 7600 7610 7620 7630 7640 7650 7660 7670 7680

AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 7690 7700 5 15 25 35 45 55 65 75 85 95

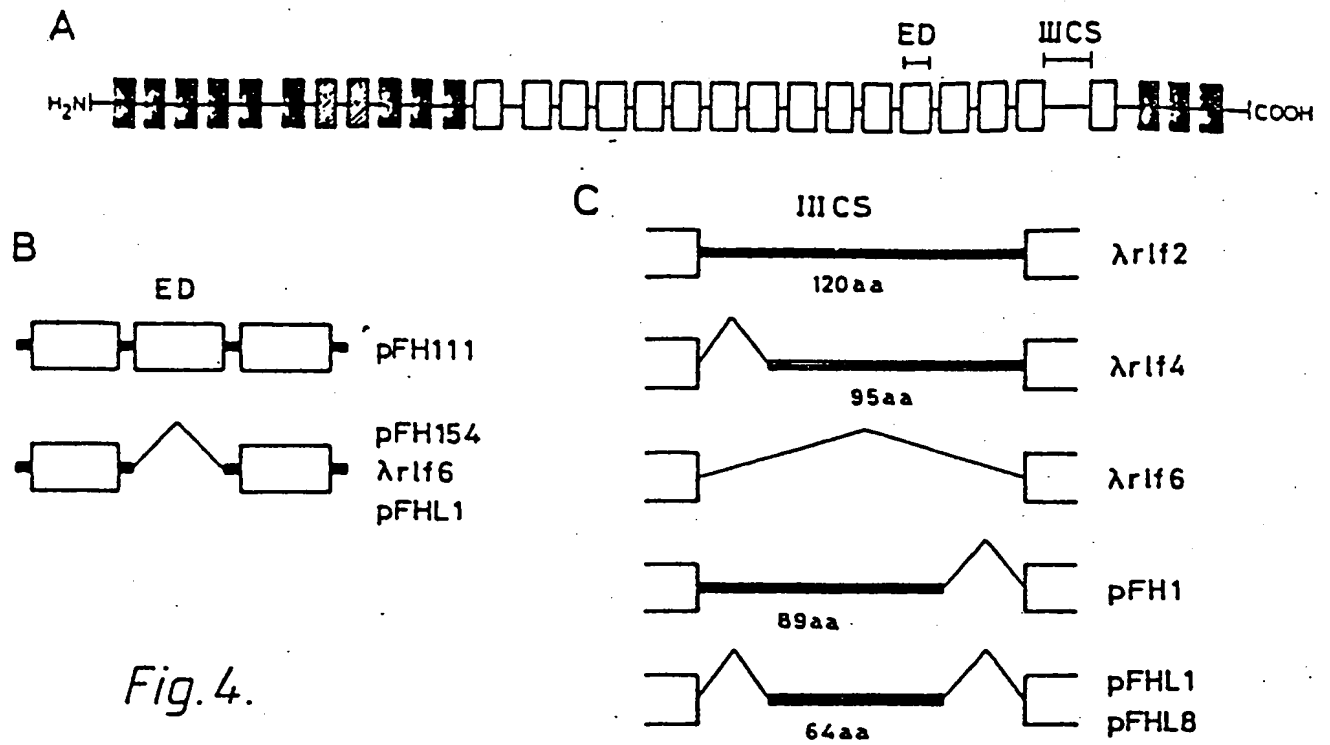
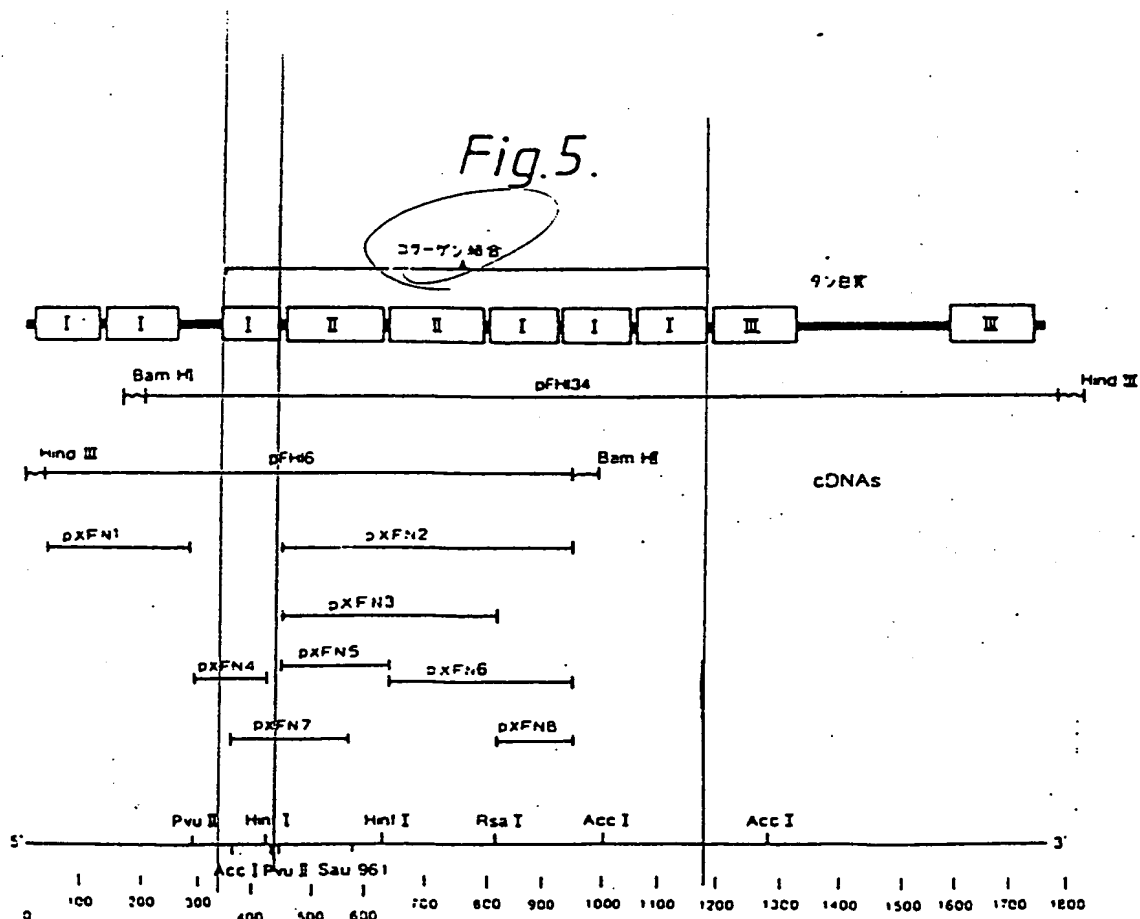


Fig.4.



第1頁の続き

① Int. Cl. 4

識別記号

庁内整理番号

// A 61 K 35/12
 (C 12 P 21/00
 C 12 R 1:19)
 (C 12 P 21/00
 C 12 R 1:865)

7138-4C

手続補正書(自発)

昭和61年7月29日

特許庁長官殿

1. 事件の表示

昭和61年特許庁審判151315号

2. 発明の名称

フィブロネクテン

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

氏名 ギルタ バイオテクノロジー リミテッド
 (名称)

4. 代理人

住所 〒100 東京都千代田区大手町二丁目2番1号
 新大手町ビルディング331
 電話 (211) 3651 (代表)
 氏名 (6669) 浅村 皓

5. 補正命令の日付

昭和 年 月 日

6. 補正により増加する発明の数

7. 補正の対象

図 面

8. 補正の内容 別紙のとおり

両面の修正 (内容に変更なし)

方式
審査修正
本

手続補正書(方式)

昭和61年11月4日

特許庁長官殿

1. 事件の表示

昭和61年特許庁審判151315号

2. 発明の名称

フィブロネクテン

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

氏名 ギルタ バイオテクノロジー リミテッド
 (名称)

4. 代理人

住所 〒100 東京都千代田区大手町二丁目2番1号
 新大手町ビルディング331
 電話 (211) 3651 (代表)
 氏名 (6669) 浅村 皓

5. 補正命令の日付

昭和61年9月30日

6. 補正により増加する発明の数

7. 補正の対象

明細書(特許請求の範囲を含む)

図面の修正(特許請求の範囲を含む)

代表者(特許請求の範囲を含む)

8. 補正の内容

別紙のとおり
 明細書の修正 (内容に変更なし)